

ics simulations and laser kinetic spectroscopy. / S. V. Lepeshkevich, S. A. Biziuk, A. M. Lemeza, B. M. Dzhagarov // Biochim. Biophys. Acta – 2011. – V. 1814. – P.1279-1288.

ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННАЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА ВНУТРИ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАНООБЪЕКТОВ

Лепешкевич С.В., Пархоц М.В., Жарникова Е.С., Джагаров Б.М.

Институт физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Синглетный кислород ($^1\text{O}_2$) играет принципиально важную роль во многих химических, биофизических и биохимических системах. Данная активная форма кислорода является основным агентом в разрушении опухолевых тканей при фотодинамической терапии онкологических заболеваний. В последние годы большое число работ направлено на определение квантовых выходов образования синглетного кислорода в системах, содержащих наночастицы различных типов. Известно, что характеристики синглетного кислорода существенным образом зависят от диэлектрических свойств окружающей среды. Тем не менее, до сих пор не решен вопрос, каким образом изменяются люминесцентные характеристики синглетного кислорода внутри, а также на поверхности и вблизи наносистем.

В данной работе представлены результаты исследований фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода внутри биологических нанобъектов – Zn-замещенных гембелков. Нативные гембелки имеют в своем составе гем - Fe-протопорфирин IX, не способный генерировать синглетный кислород ввиду малого времени жизни возбужденных $\pi\pi^*$ -состояний. Замена Fe-протопорфирина IX на Zn-протопорфирин IX позволяет получить биологический нанобъект, в котором фотосенсибилизатор (ФС) находится внутри белковой матрицы, при этом не нарушается нативная структура и конформационная подвижность белков.

Zn-замещенные гембелки были получены кислотнo-бутанонным методом [1]. Люминесценция синглетного кислорода регистрировалась на созданном в Институте физики НАН Беларуси высокочувствительном лазерном флуорометре для ближнего ИК-диапазона [2]. Возбуждение

осуществлялось на длине волны 532 нм с частотой 2.5 кГц. В качестве эталона использовался водорастворимый порфирин ТМРуР⁴⁺ в воде.

Полученные кинетики люминесценции синглетного кислорода фотосенсибилизированного ТМРуР⁴⁺ и Zn-замещенным миоглобином (ZnMb) представлены на рисунке 1.

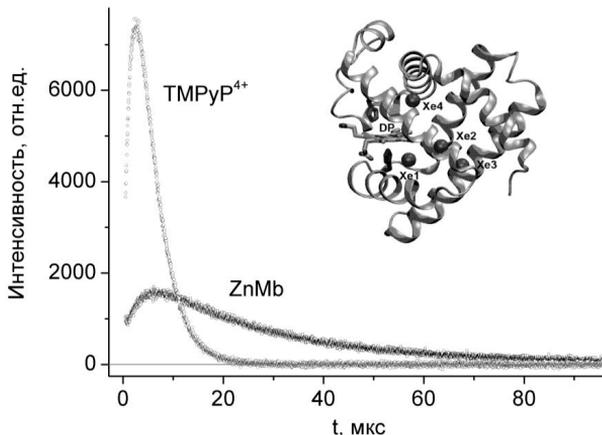


Рисунок 1 - Кинетика люминесценции синглетного кислорода фотосенсибилизированного Zn-замещенным миоглобином и ТМРуР⁴⁺ в буферном растворе рН 7.4. На вставке приведена структурная формула ZnMb

Известно, что в однородных системах кинетика люминесценции ¹O₂ описывается функцией следующего вида:

$$I(t) = \frac{A}{k_1 - k_2} [\exp(-k_2 t) - \exp(-k_1 t)], \quad (1)$$

где А – коэффициент, зависящий от исходных концентраций взаимодействующих реагентов, k_1 и k_2 – соответственно константы нарастания и затухания сигнала свечения, описывающие дезактивацию триплетного состояния ФС и синглетного кислорода. В случае неоднородных систем, в частности для образцов, содержащих Zn-замещенные гембелки, кинетика не описывается функцией вида (1). Для описания генерации ¹O₂ внутри белковой матрицы и последующей его дезактивации нами была предложена кинетическая модель, учитывающая процессы излучательной и безызлучательной дезактивации ¹O₂ как в матрице белка, так и в окружающей водной среде [3]. На основании предложенной модели было получено выражение (2) для описания кинетики свечения синглетного кислорода в исследуемых системах:

$$I(t) = \chi_1 e^{-\alpha_1 t} - \chi_2 e^{-\alpha_2 t} + (\chi_2 - \chi_1) e^{-\alpha_3 t}, \quad (2)$$

где α_1 – константа скорости, описывающая дезактивацию триплетного состояния ФС, α_2 – константа скорости, описывающая дезактивацию $^1\text{O}_2$ в растворителе, α_3 – константа скорости, описывающая дезактивацию $^1\text{O}_2$ внутри белковой матрицы (k_{Δ}^p) и выход $^1\text{O}_2$ из белка в окружающую среду (k_{escape}), χ_1 , χ_2 – коэффициенты, зависящие от исходных концентраций взаимодействующих реагентов и констант α_i .

Анализ полученных кинетик показал, что во временном интервале от 0 до 576 нс существенный вклад в интенсивность сигнала вносят рассеянное лазерное излучение и флуоресценция ФС. Поэтому для анализа кинетик свечения синглетного кислорода был выбран интервал от 576 нс до 350 мкс. На основании исследований процесса повторного связывания молекулы кислорода нативными гембелками было установлено, что синглетный кислород выходит из матрицы белка за время менее 150 нс. Следовательно в выбранном временном интервале константа скорости α_3 не может быть определена непосредственно из кинетических измерений люминесценции $^1\text{O}_2$, фотосенсибилизированного Zn-замещенными гембелками, однако она может быть рассчитана с привлечением дополнительных экспериментальных данных, описывающих люминесценцию $^1\text{O}_2$, фотосенсибилизированного эталоном сравнения ТМРyP⁴⁺.

Таким образом, используя предложенный алгоритм, может быть определена константа дезактивации синглетного кислорода внутри белковой матрицы $k_{\Delta}^p = k_r^p + k_{nr}^p$, а также рассчитаны излучательная k_r^p и безызлучательная k_{nr}^p константы дезактивации синглетного кислорода внутри белка.

Предложенный алгоритм регистрации и обработки кинетик свечения синглетного кислорода был реализован на таких бионанообъектах, как Zn-замещенные гембелки. Показано, что процесс безызлучательной дезактивации $^1\text{O}_2$ в матрице белка может быть представлен в виде суммы независимых процессов тушения $^1\text{O}_2$ всеми аминокислотами белка и фотосенсибилизатором. Установлено, что константа скорости излучательной дезактивации $^1\text{O}_2$ в матрице белка в ~ 8 раз больше соответствующей константы в водной среде, что говорит о существенном влиянии матрицы белка на процесс излучательной дезактивации $^1\text{O}_2$.

Авторы благодарят Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований (№ Ф15СО-036) за финансовую поддержку.

Литература

1. Teale F.W.J. // Biochim. Biophys. Acta. – 1959. – Vol. 35. – P. 543
2. Сташевский А.С., Галиевский В.А., Джагаров Б.М. // Приборы и методы измерений. – 2011. – № 1(2). – С. 25-31.
3. Lepeshkevich S.V., Parkhats M.V., Stasheuski A.S., Britikov V.V., Jarnikova E.S., Usanov S.A., Dzhagarov B.M. // J. Phys. Chem. A. – 2014. – Vol. 118, № 10. – P. 1864-1878.

ФОСФОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ДЕНДРИМЕРОВ НА СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ БЕЛКОВ

**Лозникова С.Ж.¹, Суходола А.А.², Тихомиров С.А.²,
Milowska K.³, Majoral J.-P.⁴**

¹*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

²*Институт физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

³*Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Lodz, Poland*

⁴*Laboratoire de Chimie de Coordination, CNRS, Toulouse, France*

Быстрое развитие нанотехнологий привело к появлению нового раздела в медицине – наномедицины. Применение наноматериалов для лечения требует детального изучения их влияния на биологические структуры. Дендримеры класс полимеров, имеющий структурные преимущества перед вирусными и невирусными системами (векторами) доставки генетического материала в большие органы и ткани. При внутривенном способе введения дендримеров возможно их неспецифическое взаимодействие с белками и клетками крови, тканями стенок сосудов. Поэтому исследование механизмов взаимодействия дендримеров с регуляторными белками плазмы крови является актуальной задачей современной нанобиофизики и медицины.

В настоящее время остается недостаточно изученным характер взаимодействия дендримеров с белками. Понимание механизмов их взаимодействия является необходимым условием использования наноматериалов в медицине. В настоящей работе в качестве объектов исследования нами выбраны ферментативные белки – щелочная фосфатаза (ЩФ), тромбин, лактат-дегидрогеназа (ЛДГ) и аспартат трансминаза (АСТ). Исследовалось взаимодействие белков с фосфорными (ФД) и полиами-